昆虫学报 Acta Entomologica Sinica, March 2016, 59(3): 292 – 300 doi:10.16380/j.kcxb.2016.03.005

Bt 杀虫蛋白处理后二化螟幼虫中肠细菌群落的变化

李　振[1,2]，韩兰芝[1]，刘玉娣[1,*]，侯茂林[1]

（1. 中国农业科学院植物保护研究所，植物病虫害生物学国家重点实验室，北京 100193；
2. 福建农林大学植物保护学院，福州 350002）

摘要：【目的】为探讨经 Bt 杀虫蛋白处理后二化螟 *Chilo suppressalis* (Walker) 幼虫中肠细菌群落的差异。【方法】本研究对采自北京(BJ)和福州(FZ)2 个地区在室内分别经过未用 Bt 杀虫蛋白和使用 Bt 杀虫蛋白(Cry1Ab, Cry1Ac 和 Cry1Ca)多代汰选条件下的二化螟幼虫中肠进行解剖,采用变性梯度凝胶电泳(DGGE)和 Illumina MiSeq 技术测序平台对 3 个处理组(BJCry1Ab, BJCry1Ac 和 FZ1Ca)和 2 个对照组(BJCK 和 FZCK)中肠细菌的 16S rDNA V3 可变区进行电泳检测和高通量测序。【结果】DGGE 图谱显示,5 个不同处理组的细菌不仅丰富度存在差异,同时同种细菌在不同处理组中的比例也存在差异。高通量测序结果表明,优势菌为厚壁菌门(Firmicutes)的肠球菌属 *Enterococcus*,其次为乳杆菌属 *Lactobacillus* 和芽孢杆菌属 *Bacillus*, 以及变形菌门(Proteobacteria)、绿弯菌门(Chloroflexi)和拟杆菌门(Bacteroidetes)。同一地区的二化螟种群,Bt 杀虫蛋白处理组(BJCry1Ab, BJCry1Ac 和 FZ1Ca)的二化螟幼虫与对照组(BJCK 和 FZCK)相比,优势菌肠球菌属 *Enterococcus* 比重均有所增加,而乳杆菌属 *Lactobacilluss* 所占比重均有所降低。北京和福州这 2 个地区未用 Bt 杀虫蛋白处理的对照组之间肠道菌落的结构也存在一定差异。【结论】经 Bt 杀虫蛋白处理后二化螟幼虫中肠细菌群落的丰富度出现变化,推测可能与二化螟取食不同 Bt 杀虫蛋白、地理位置差异以及饲养代数不同有关。

关键词：二化螟；中肠；变性梯度凝胶电泳；16S rDNA 文库；细菌群落多样性；苏云金芽孢杆菌

中图分类号：Q965.8　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**0454-6296(2016)03-0292-09

Change in the diversity of bacterial community in larval midguts of the striped stem borer, *Chilo suppressalis* (Lepidoptera: Crambidae), after treatment with *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins

LI Zhen[1,2], HAN Lan-Zhi[1], LIU Yu-Di[1,*], HOU Mao-Lin[1] (1. State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China; 2. College of Plant Protection, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

Abstract:【Aim】To clarify the change in the bacterial community in larval midguts of the striped stem borer, *Chilo suppressalis* (Lepidoptera: Crambidae) after treatment with *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins.【Methods】Midguts were dissected from *C. suppressalis* larvae that were collected from Beijing (BJ) and Fuzhou (FZ) of China and successively reared with artificial diets without Bt insecticidal proteins and with Bt insecticidal proteins (Cry1Ab, Cry1Ac and Cry1Ca), respectively. Degeneration gradient gel electrophoresis (DGGE) and Illumina MiSeq platform were employed to detect the bacterial community in these midguts and to compare its difference among different treatments (BJCK, BJCry1Ab,

基金项目：国家自然科学基金项目(31370439)；欧盟援助项目(DCI Food/2010/230-238)
作者简介：李振，女，1992 年 1 月生，河南太康人，硕士研究生，研究方向为昆虫生化与分子生物学，E-mail：lz19920110@126.com
* 通讯作者 Corresponding author, E-mail：ydliu@ippcaas.cn
收稿日期 Received：2015-12-21；接受日期 Accepted：2016-02-04

BJCry1Ac, FZCK and FZ1Ca) of the two populations. 【Results】The DGGE profiles demonstrated that there was difference in bacterial abundance in larval midguts of *C. suppressalis* among different treatments. Analyses on DNA sequence of 16S rDNA libraries indicated that among the midgut bacteria *Enterococcus* bacteria of Firmicutes was the most dominant, followed by bacteria of *Lactobacillus* and *Bacillus* (Firmicutes), Proteobacteria, Chloroflexi, and Bacteroidetes. The proportions of the dominant *Enterococcus* bacteria in the larvae treated with Bt insecticidal proteins (BJCry1Ab, BJCry1Ac and FZ1Ca) were higher than those in the larvae without treatment with Bt (BJCK and FZCK), but the proportions of *Lactobacillus* bacteria were lower in the larvae treated with Bt insecticidal proteins. The bacterial abundance also differed between BJCK and FZCK. 【Conclusion】The results suggest that the bacterial abundance in larval midguts of *C. suppressalis* changes after treatment with Bt insecticidal proteins, which may be related to the difference in Bt insecticidal proteins, geographical sites and successive rearing time.

Key words: *Chilo suppressalis*; midgut; PCR-DGGE; 16S rDNA libraries; bacterial; *Bacillus thuringiensis*

昆虫体内的肠道微生物构成了昆虫肠道的微生态体系。它们在昆虫肠道内定殖,完成生长、代谢、增殖等全部生命活动。在某些情况下,肠道共生菌已经与昆虫形成专性共生关系,影响着昆虫的生长和发育,参与昆虫的消化、营养吸收和繁殖(张珏峰等, 2013),而且肠道细菌对信息素的产生、维生素的合成、杀虫剂的降解以及病菌的防御也有重要的作用(Brand *et al*., 1975; Dillon *et al*., 2002, 2005; Mrázek *et al*., 2008)。

二化螟 *Chilo suppressalis* (Walker)属鳞翅目(Lepidoptera)草螟科(Crambidae),是一种重要的钻蛀性水稻害虫。Bt 抗虫转基因水稻的成功培育为二化螟的防治提供了新的策略,但二化螟对 Bt 杀虫蛋白的抗性将是制约其发展的关键因素之一。最近十年来,已有一些关于 Bt 杀虫蛋白对昆虫肠道细菌影响的研究报道,Broderick 等(2006)首次从舞毒蛾 *Lymantria dispar* 中肠中发现 Bt 杀虫活性的发挥必须依赖于肠杆菌 *Enterobacter* sp. NAB3。2009 年,他们在 6 种鳞翅目昆虫中验证了之前的研究结果,并且还发现 Bt 活性与中肠微生物的关系因昆虫种类而异(Broderick *et al*., 2009)。但是 Raymond 等(2009)在同年发现小菜蛾 *Plutella xylostella* 中肠细菌并不是 Bt 发挥杀虫活性所必需的。张浩等(2012)发现对 Bt 蛋白抗性和敏感的棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 中肠细菌群落中优势菌种很相似,而劣势菌种存在差异,表明肠道菌在 Bt 杀虫过程中对棉铃虫起到保护作用。鉴于目前 Bt 杀虫蛋白对二化螟肠道细菌群落的影响状况仍未清楚,因此研究取食 Bt 杀虫蛋白后二化螟幼虫肠道微生物的群落结构的变化,对于明确二化螟肠道细菌与 Bt 杀虫蛋白之间的关系具有重要的意义。

传统的微生物培养是分析肠道微生物群落多样性和鉴定肠道微生物种类最经典的方法。但是由于环境中的微生物约有 90% 不能培养(Amann *et al*., 1995),并且菌株培养鉴定过程繁琐且容易出现偏差,随着分子生物学的发展,基于核酸序列分析的现代分子生物学技术已广泛应用到昆虫的肠道微生物学研究中。细菌核糖体 16S rDNA 基因可变区是此类生物物种的特征核酸序列,可用来进行细菌的分类鉴定。基于 16S rDNA 基因的聚合酶链式反应的变性梯度凝胶电泳(polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis, PCR-DGGE)技术,理论上在条件适当的情况下能检测出来只有 1 个核酸差异的 DNA 片段(Muyzer *et al*., 1993),对复杂的肠道微生物的快速鉴定有很大的优势,因此在肠道微生物鉴定中得到了广泛的应用。王甸洪等(2012)运用 PCR-DGGE 和 16S rRNA 文库相结合的方法研究了螺旋粉虱 *Aleurodicus dispersus* 体内细菌多样性和主要优势菌群结构。相辉等(2007)采用基于 16S rDNA 的 DGGE 和 16S rDNA 文库序列分析的手段发现专食性和广食性品系的家蚕 *Bombyx mori* 幼虫中肠内的特殊菌群发生一定的变化。通过采用 16S rDNA 的 DGGE 的方法对用转基因和非转基因棉花饲喂的意大利蜜蜂 *Apis mellifera ligustica* 的肠道细菌群落研究发现,其组成差异并不明显(姜玮瑜等, 2010)。尽管 PCR-DGGE 技术在肠道微生物的鉴定中具有较大优势,但该技术采用切胶克隆测序的方法来鉴定细菌种类,这种方法难免会造成遗漏。本研究除采用 DGGE 电泳图谱鉴定的方法外,还进一步采用高通量测序技术手段对 16S rDNA 基因 V3 区的 PCR 产物进行了检测,以期得到更加完整的菌落信息。

本研究以二化螟为供试昆虫,采用 DGGE 和高通量测序技术,对在室内使用人工饲料(添加不同 Bt 杀虫蛋白和未添加 Bt 杀虫蛋白)饲养多代的北京和福州两个地区的二化螟幼虫中肠细菌进行研究。通过比较不同处理组的二化螟幼虫中肠细菌的群落多样性及群落结构的变化,探讨肠道细菌与 Bt 杀虫蛋白之间的关系,进而为阐明 Bt 杀虫机制提供一定的借鉴和参考。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

分别在北京(2008 年 10 月)和福州(2012 年 8 月)2 个地区田间采集二化螟幼虫,在室内用人工饲料饲养,饲养条件为:温度 27 ± 1℃,相对湿度 75% ±10%,光周期 16L∶8D。以人工饲料中未添加 Bt 杀虫蛋白的北京种群(BJCK)和福州种群(FZCK)为对照组,以人工饲料中添加 Cry1Ac 和 Cry1Ab 毒素的北京种群和添加 Cry1Ca 毒素的福州种群为相应的处理组(表 1)。

1.2 肠道的解剖与保存

二化螟幼虫生长发育到 4 龄初期时,每个处理取 105 头幼虫的中肠。在无菌操作条件下解剖出中肠,将中肠放入 1.5 mL 离心管中,每管 35 头幼虫中肠,每个处理 3 管。离心管中提前放入 0.7% 的生理盐水 500 μL,单管编号,放入 –80℃冰箱保存。

1.3 DNA 的提取和 PCR 扩增

细菌 DNA 提取采用 PowerSoil® Isolation DNA Kit DNA 提取试剂盒(MoBio Laboratories Inc., Carlsbad, California),将提取的 DNA 溶解于 250 μL 的 ddH_2O 中。用 16S rDNA V3 区的引物 338F(5′-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3′)和 534R[5′-CGCCCGCCGCGCGCGGCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGG(ATTACCGCGGCT GCTGG)-3′]分别扩增 5 个处理的二化螟幼虫中肠的 16S rDNA V3 区以构建文库。50 μL PCR 反应体系包含:模板 DNA 2.5 ng,引物 338F(20 μmol/L)1 μL,引物 534R(20 μmol/L)1 μL,10 × PCR Buffer 5 μL,dNTPs Mixture(各 2.5 mmol/L)4 μL,rTaq 酶(5 U/μL)0.25 μL(TaKaRa,大连),ddH_2O 补至 50 μL。PCR 扩增程序为:94℃预变性 10 min;94℃变性 1 min,55℃退火 1 min(每个循环降低 0.1℃),72℃延伸 1 min 30 s,循环 30 次;最终 72℃延伸 10 min。PCR 产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测,上样顺序依次为 BJCK, BJCry1Ab, BJCry1Ac, FZCK, FZ1Ca 和 1 kb plus DNA Ladder (MD113)(天根生化科技有限公司,北京)。

1.4 变性梯度凝胶电泳

采用 DGGE 对 5 个样本的 PCR 产物进行电泳分离,胶浓度为 10%,凝胶变性范围为 40% ~60%。电泳条件为电压 65 V,电泳 16 h。电泳结束后使用银染法染色,步骤如下:采用 10% 乙酸进行固定,取 450 mL 纯水,加冰醋酸 50 mL 混合,固定 30 min,中间摇晃数次;水洗 3 次,每次 2 min;用 0.1% $AgNO_3$ 染色,取 0.4 g $AgNO_3$ 加入 400 mL 纯水中,再加入甲醛 400 μL,轻摇 25 min;水洗 20 s;用 20% Na_2CO_3 显色,取 12.5 g Na_2CO_3 加入 500 mL 纯水中,加入甲醛 500 μL,$Na_2S_2O_3$ 100 μL(初始浓度为 100 mg/mL);10% 乙酸固定 10 min,放入纯水中。用凝胶成像系统直接拍照记录条带图谱。图谱分析:通过一系列的文件转换,采用 Phylip 4.0 软件计算分离度;采用 Mega 5.0(Kumar *et al*., 2004)对不同处理组进行聚类分析,根据 Kimura 2-Parameter 选用邻接法(Neighbor-Joining, NJ)(Felsenstein, 1985)构建不同种群的进化树,进化树分支的置信度采用自展法(Bootstrap)重复检测 1 000 次。

1.5 高通量测序及序列分析

5 个样品细菌 DNA 的提取和 PCR 扩增同 1.3 节,用 NEB Next® UltraTM DNA Library Prep Kit for Illumina 建库试剂盒(New England Biolabs,美国)进行文库的构建,构建好的文库经过 Qubit 定量和文库检测合格后,采用 Illumina MiSeq 技术测序平台(北京诺禾致源生物信息科技有限公司)对 5 个样品 16S rDNA 的 V3 区 PCR 产物进行双端测序。为了使信息分析的结果更加准确、可靠,使用 QIIME (Caporaso *et al*., 2010)软件对测序的得到的原始数据(raw data)进行过滤得到有效数据(clean data)。通过 flash 软件(Magoč and Salzberg, 2011)将有重叠区(overlap)的一对 reads 拼接成 tags,对拼接得到的 reads 数目进行统计。使用 UCLUS 软件(Edgar, 2010)在 97% 相似度下将序列聚类成为 OTUs (operational taxonomic units),这里 OTUs 表示的是一组来源于某一个相同分类单元的序列,属于同一 OTU 的一组序列在系统分类学上十分接近,从中取 1 条代表性的序列用于下游的物种注释分析。使用 RDP (ribosomal database project) classifier(Wang *et al*., 2007)对代表性的序列进行物种注释,统计每个样品在各分类水平上(phylum, class, order, family 和 genus)的构成,用柱状图进行可视化。

表 1　不同种群二化螟幼虫的实验处理

Table 1　Experimental treatments of *Chilo suppressalis* larvae from different populations

样本代码 Sample code	采集地点 Collecting locality	饲养代数 Rearing generation	实验处理 Experimental treatment
BJCK	北京 Beijing	52	未用 Bt 毒素处理二化螟北京种群 Beijing population without treatment with Bt toxins
BJCry1Ab	北京 Beijing	40	Cry1Ab 处理二化螟北京种群 Beijing population treated with Cry1Ab
BJCry1Ac	北京 Beijing	44	Cry1Ac 处理二化螟北京种群 Beijing population treated with Cry1Ac
FZCK	福建福州 Fuzhou, Fujian	6	未用 Bt 毒素处理二化螟福州种群 Fuzhou population without treatment with Bt toxins
FZ1Ca	福建福州 Fuzhou, Fujian	3	Cry1Ca 处理二化螟福州种群 Fuzhou population treated with Cry1Ca

2　结果

2.1　二化螟肠道 DNA 的提取和 PCR 扩增

5 个不同处理组的 16S rDNA V3 区的 PCR 扩增产物，经电泳检测均在 195 kb 左右出现明显的条带（图 1），与预期产物大小相符，且特异性良好，故直接用于 DGGE 电泳分析和高通量测序。

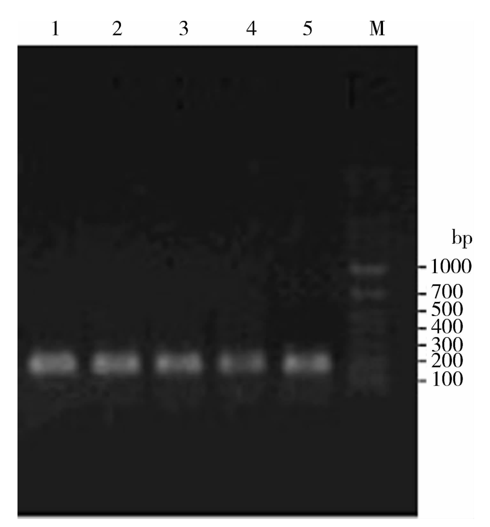


图 1　不同种群不同处理二化螟幼虫肠道 DNA 16S rDNA V3 区 PCR 产物检测结果

Fig. 1　Analysis of PCR products of 16S rDNA V3 fragment of DNA from the midguts of *Chilo suppressalis* larvae from different populations subjected to different treatments

1：BJCK；2：BJCry1Ab；3：BJCry1Ac；4：FZCK；5，FZ1Ca；M：1 kb plus DNA Ladder（MD113）。样本代码同表 1；下同。Sample codes see Table 1. The same below.

2.2　二化螟幼虫中肠细菌 16S rDNA V3 区序列 PCR-DGGE 图谱分析

不同处理组的二化螟幼虫中肠细菌的 16S rDNA V3 区序列的 DGGE 图谱（图 2）分析表明：5 个处理组的条带丰富度有差异，并且在条带亮度上也有明显差异，说明同种微生物在不同处理组中的比例存在差异。经室内饲养多代以后，北京种群 BJCry1Ab 和 BJCry1Ac 处理组与对照组 BJCK 相比，细菌群落结构出现一定的分化，如条带 12、条带 23 和条带 29 虽然在其他 3 个处理中都有检测到，但是 BJCK 组中的亮度明显强于 BJCry1Ab 和 BJCry1Ac 处理组；条带 17 在 BJCry1Ab 和 BJCry1Ac 处理组的亮度明显强于 BJCK 对照组，亮度由高到低依次为 BJCry1Ac，BJCry1Ab 和 BJCK。不同的 Bt 杀虫蛋白处理后的北京种群之间也有差异，条带 25 在 BJCry1Ab 组中亮度明显强于 BJCry1Ac 组，在 BJCry1Ab 检测到的条带 31 和 32 在 BJCry1Ac 中没有检测到。福州种群由于饲养代数较少，对照组（FZCK）

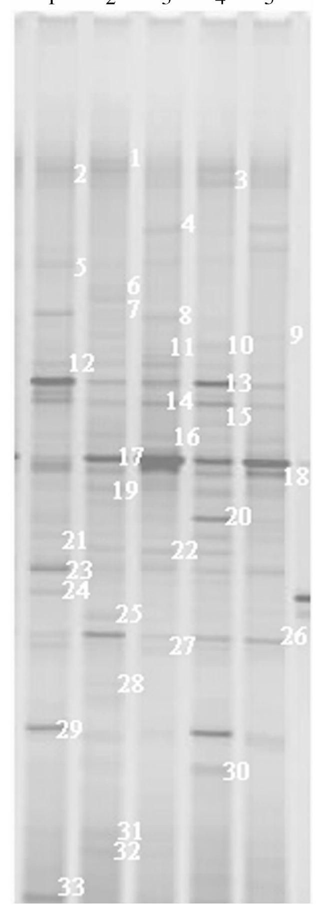


图 2　不同种群不同处理二化螟幼虫中肠细菌 DGGE 图谱

Fig. 2　DGGE profiles of bacterial community in the midguts of *Chilo suppressalis* larvae from different populations subjected to different treatments

1：BJCK；2：BJCry1Ab；3：BJCry1Ac；4：FZCK；5：FZ1Ca.

细菌的丰富度明显高于处理组(FZ1Ca),除条带 17 和 18 外, FZCK 条带亮度均强于 FZ1Ca, 说明 Cry1Ca 毒素的处理可能降低了二化螟中肠内菌群的丰富度,减少了细菌的数量。北京和福州两个地区对照种群细菌菌落相似,但个别条带的亮度也有差异,说明可能这两个处理组的地理差异或者饲养代数的不同而对二化螟幼虫中肠细菌菌落结构有影响。

2.3 二化螟幼虫中肠细菌菌落结构和生物信息学

高通量测序结果表明 5 个样品总共获得 224 700条 Clean Reads(过滤后得到的拼接序列数),每个样品平均有44 940 条,Clean Reads 平均长度为 156.3 bp。根据 Barcode 序列将 Reads 按照样品来源进行分拣,并对每个样品的 Reads 数目和注释成功的 Reads 数目进行统计(表 2)。

表 2 reads 数目统计

Table 2 Number of reads

样品代码 Sample ID	Reads 数目 Number of reads	注释的 Reads 数目 Number of annotated reads
BJCK	75 544	66 441
BJCry1Ab	37 038	32 747
BJCry1Ac	37 716	33 359
FZCK	42 639	36 383
FZ1Ca	31 763	28 204

基于 OTUs 的分类结果(图 3),在门分类阶元水平,5 个处理组注释到了厚壁菌门(Firmicutes)、变形菌门(Proteobacteria)、绿弯菌门(Chloroflexi)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、放线菌门(Actinobacteria)、酸杆菌门(Acidobacteria)、蓝藻门(Cyanobacteria)、硝化螺旋菌门(Nitrospirae)、疣微菌门(Verrucomicrobia)等,还有一些未注释成功的。其中厚壁菌门为绝对优势菌,其次是变形菌门和绿弯菌门。厚壁菌门中的肠球菌属 *Enterococcus* 为优势菌,在 5 个处理组中所占比重分别为 70.92%, 80.37%, 81.68%, 62.42% 和 84.55%(表 3);其次是乳杆菌属 *Lactobacillus*,所占比重依次为 13.05%, 2.54%, 4.15%, 2.91% 和 0.84%(表 3)。在变形菌门中主要是 α-变形菌纲(Alpha-proteobacteria)、β-变形菌纲(Beta-proteobacteria)、γ-变形菌纲(Gamma-proteobacteria)(表 3)。放线菌门和拟杆菌门等也占一定比重(表 3)。

对于北京种群,在室内人工饲料饲喂几十代后,优势菌肠球菌属在 BJCK 组中所占比重低于 BJCry1Ab 和 BJCry1Ac 组,而次优势菌乳杆菌属在 BJCK 组中所占比重高于 BJCry1Ab 和 BJCry1Ac 组。葡萄菌球属 *Staphylococcus* 在对照组 BJCK 中占 0.57%,而在

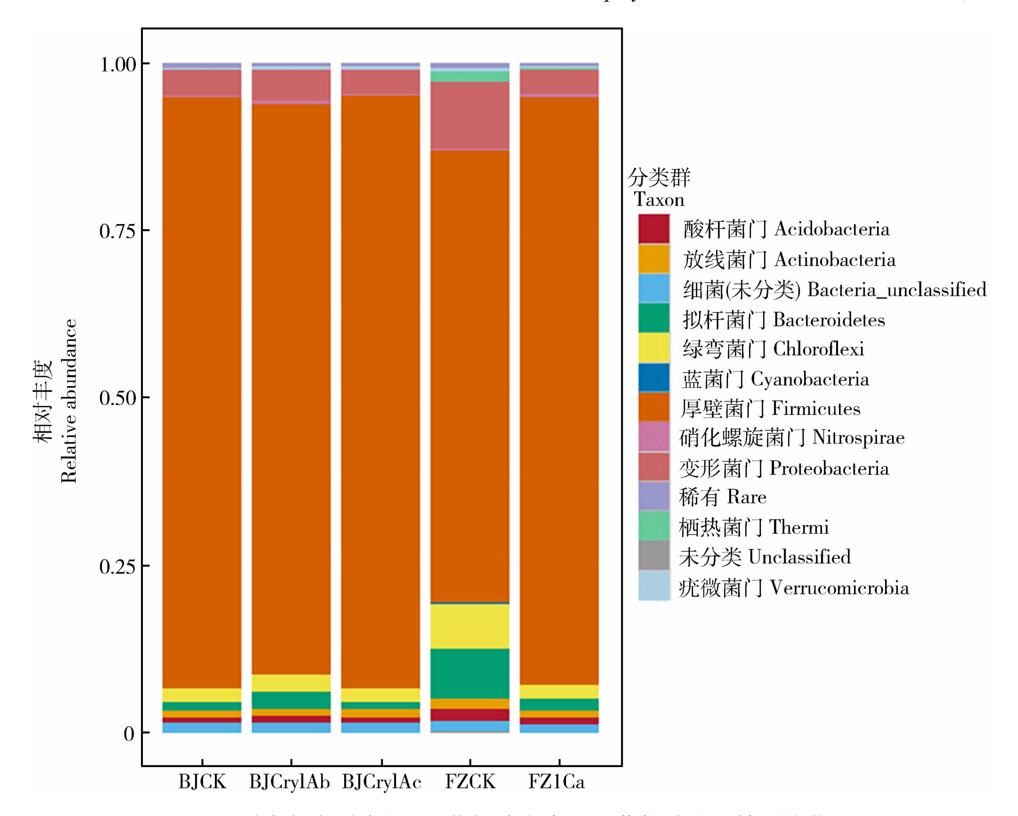


图 3 不同种群不同处理二化螟幼虫中肠细菌物种注释结果柱状图

Fig. 3 Histogram of species annotation results of bacterial community in the midgut of *Chilo suppressalis* larvae from different populations subjected to different treatments

表 3　不同种群不同处理二化螟幼虫中肠细菌属的相对丰度(%)

Table 3　Relative abundance (%) of bacterial genera in the midgut of *Chilo suppressalis* larvae from different populations subjected to different treatments

类群 Group	纲/属 Class/Genus	BJCK	BJCryAb	BJCry1Ac	FZCK	FZ1Ca
厚壁菌门 Firmicutes		88.11	85.27	88.20	67.40	87.70
	肠球菌属 *Enterococcus*	70.92	80.37	81.68	62.42	84.55
	乳杆菌属 *Lactobacillus*	13.05	2.54	4.15	2.91	0.84
	芽孢杆菌属 *Bacillus*	0.46	0.45	0.46	0.37	0.31
	葡萄菌球属 *Staphylococcus*	0.57	0.01	0.00	0.01	0.01
	其他 Others	3.11	1.90	1.91	1.69	1.99
绿弯菌门 Chloroflexi		2.13	2.40	2.03	6.64	2.12
变形菌门 Proteobacteria		3.68	4.76	3.58	9.99	3.77
	α-变形菌纲 Alphaproteobacteria	0.77	1.41	1.00	4.27	0.83
	β-变形菌纲 Betaproteobacteria	1.26	1.62	1.02	2.97	1.50
	γ-变形菌纲 Gammaproteobacteria	0.44	0.59	0.37	1.37	0.43
	其他 Others	1.21	1.14	1.19	1.38	1.01
拟杆菌门 Bacteroidetes		1.34	2.56	1.05	7.41	1.64
放线菌门 Actinobacteria		0.99	1.03	1.23	1.54	1.13
酸杆菌门 Acidobacteria		0.76	1.03	0.83	1.66	0.87
硝化螺旋菌门 Nitrospirae		0.34	0.34	0.44	0.35	0.34
蓝菌门 Cyanobacteria		0.06	0.07	0.10	0.25	0.09
疣微菌门 Verrucomicrobia		0.28	0.33	0.31	0.40	0.28
栖热菌门 Thermi		0.10	0.04	0.05	1.58	0.12
其他 Others		2.21	2.17	2.18	2.78	1.94

而在另外 4 个处理组所占比重接近于 0。BJCK 和 BJCry1Ac 处理组在门分类阶元上比重相似，而 BJCry1Ab 与北京种群的另外两组比重分布有差异，变形菌门和拟杆菌门在 BJCry1Ab 处理组中所占比重较另外两组大。DGGE 图谱聚类分析(图 3)结果也证实了这个结论，同样是北京种群，经过人工饲料中添加 Cry1Ab 和 Cry1Ac 饲养 40 代以后肠道细菌群落出现分化，3 个处理组分别聚类到不同的分支，BJCry1Ac 组与 BJCK 组最为接近，相似性系数达到 76%(表 4)，而 BJCry1Ab 处理组单独聚为一支，与对照组相似性系数只有 55%。

对于福州种群，对照组 FZCK 菌落的丰富度明显高于 FZ1Ca。在门分类阶元上，变形菌门、绿弯菌门、拟杆菌门和放线菌门在 FZ1Ca 组所占比重均比对照组 FZCK 中有所下降，而优势菌厚壁菌门所占比重上升，其中绝对优势菌肠球菌属在 FZCK 中所占比重低于 FZ1Ca。酸杆菌门、蓝藻门和疣微菌门这 3 种劣势菌在福州种群的两组处理所占比重也有差异，同样是经过 Cry1Ca 毒素处理后所占比重下降。DGGE 图谱聚类分析(图 4)结果表明，福州种群的两个处理组聚为不同的分支，相似性系数为 76%。

表 4　各处理之间的相似性系数

Table 4　Similarity indexes among different treatments

样本代码 Sample codes	BJCK	BJCryAb	BJCry1Ac	FZCK	FZ1Ca
BJCK	1				
BJCry1Ab	0.55	1			
BJCry1Ac	0.76	0.67	1		
FZCK	0.76	0.67	0.70	1	
FZ1Ca	0.76	0.67	0.82	0.76	1

通过对 BJCK 组和 FZCK 处理组的比较可以看出，这 2 个地区二化螟种群中肠细菌群落结构有差异。优势菌肠球菌属、乳杆菌属在 BJCK 组所占比重较 FZCK 组大。而变形菌门、绿弯菌门、拟杆菌门和许多劣势菌等则在 FZCK 组中所占比重较大。DGGE 图谱聚类分析结果表明，BJCK 和 FZCK 聚为一支，且相似性系数为 76%，说明 2 个地区二化螟幼虫中肠的细菌群落差异不大。而 BJCry1Ac 和 FZ1Ca 处理组细菌群落结构最相似，根据 DGGE 图谱聚类分析这 2 个处理组聚为一支(图 4)，且相似性系数高达 82%，说明 Cry1Ca 和 Cry1Ac 毒素对二化螟中肠细菌有着相似的影响。

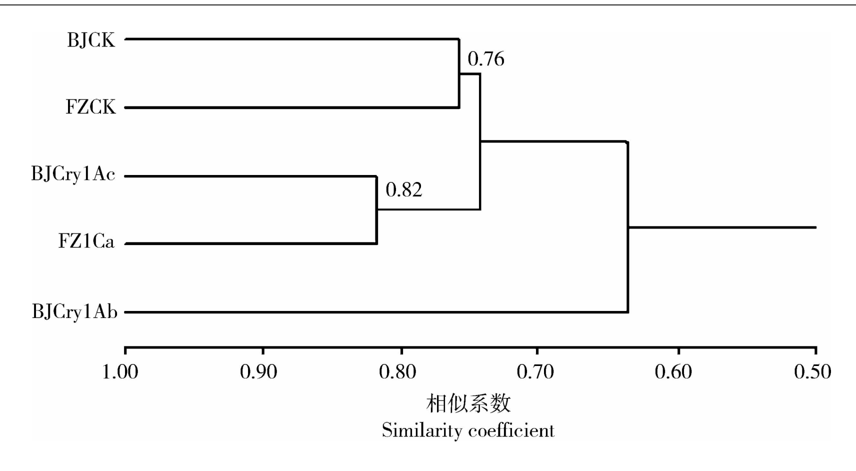


图 4 不同种群不同处理二化螟幼虫中肠细菌 DGGE 图谱聚类分析

Fig. 4 Clustering analysis of DGGE profile of bacterial community in the midgut of *Chilo suppressalis* larvae from different populations subjected to different treatments

分支上的数字为自引导值(Bootstrap),节点上 >50% 的自引值标出,重复次数为 1 000。Numbers at nodes indicate the statistical support obtained from 1 000 bootstrap replicates; only reliability percentages above 50% are indicated.

3 讨论

通过对 5 个不同处理组的二化螟中肠细菌的 16S rDNA V3 区的 PCR 产物 DGGE 电泳图谱对比分析和高通量测序,发现 5 个不同处理组的二化螟中肠细菌群落结构存在一定的差异。二化螟中肠细菌种类丰富,优势细菌是厚壁菌门的肠球菌属和乳杆菌属,其次是变形菌门、绿弯菌门、拟杆菌门和放线菌门等。厚壁菌门是绝对优势菌种,一些其他的研究也得到了类似的结果,Rani 等(2009)通过分离室内饲养和田间采集的斯氏按蚊 *Anopheles stephensi* 肠道内的微生物种群发现,优势种群为 γ-变形菌纲和厚壁菌门。厚壁菌门也是地下害虫蛴螬肠道内的绝对优势菌(黄胜威, 2012)。

同一地区种群的二化螟在实验室饲养几到几十代以后,对照组与处理组的二化螟幼虫中肠细菌所占比重有所不同,处理组的中肠优势菌肠球菌属比重增加,而优势菌乳杆菌属在处理组中所占比重下降。北京和福州这两个不同地区的二化螟种群在不含 Bt 杀虫蛋白的饲料中饲喂不同的代数后,其中肠菌落的结构丰度也有一定的差异。一方面可能是由于两个处理的饲养代数差异造成的,另一方面也可能是由于地区的不同而产生的差异。张珏峰等(2013)发现不同抗药性水平的黑龙江、连云港、瑞安和诸暨种群二化螟中肠细菌群落丰富度存在差异,因此可能与不同地区二化螟种群所处的地理环境、抗药性筛选等有关。

肠球菌属在处理组 BJCry1Ab, BJCry1Ac 和 FZ1Ca 与相应的对照组 BJCK 和 FZCK 相比,所占比重明显增加,而 2 个对照组 BJCK 和 FZCK 肠球菌属所占比重相似,说明二化螟幼虫肠道内可能通过肠球菌属比重的增加,来适应 Bt 杀虫蛋白的处理,也有可能这类菌更能耐受有 Bt 杀虫蛋白的肠道环境。Johnston 和 Crickmore (2009) 以及 Raymond 等(2009)通过用抗生素和不用抗生素处理的无菌昆虫验证了烟草天蛾 *Manduca sexta* 和小菜蛾的肠道内的肠球菌能部分降低 Cry1Ac 的杀虫活性。舞毒蛾幼虫肠道内共生的肠球菌也能降低苏云金芽孢杆菌的杀虫活性(Broderick *et al.*, 2004)。由此推断肠球菌属作为昆虫肠道环境绝对优势菌,对寄主有十分重要的意义,使用 Bt 杀虫蛋白处理可能会导致该菌比重增加,说明该菌在调节昆虫的生理活动起到有益的作用。

乳杆菌属在 BJCK 组中所占比重是 BJCry1Ab 和 BJCry1Ac 组的 3~6 倍,说明乳杆菌属在二化螟幼虫受到 Bt 杀虫蛋白的影响后而导致该菌比重降低,并且不同的 Bt 杀虫蛋白对乳杆菌属的影响也有差异。在福州种群中出现相似的现象,FZCK 组乳杆菌属所占比重是 FZ1Ca 组的 3 倍左右。植物乳杆菌 *Lactobacillus plantarum* 在果蝇肠道内广泛存在,该菌在寄主营养缺乏时可以维持其正常的生命活动,还能通过影响胰岛素生长因子信号来控制果蝇的生长速度(Storelli *et al.*, 2011)。可见乳杆菌属对昆虫生理可能起到有益的作用,Bt 杀虫蛋白可能导致该菌所占比重下降,从而影响昆虫的生理活动。

芽孢杆菌属在北京和福州种群的处理组和对照组所占比重并无差异,说明二化螟幼虫中肠细菌可能有一定的承受力确保该菌所占比重不受外界因素的影响,从而保证昆虫的生理功能正常。此类细菌的重要性已在一些昆虫中有所发现,例如:用添加肠道优势菌蜡状芽孢杆菌 *Bacillus cereus* 的饲料和用青霉素消除这种微生物的饲料饲养甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua*,发现添加芽孢杆菌的甜菜夜蛾其化蛹率和蛹的重量都提高,并且幼虫龄期和死亡率均降低(李香香, 2010)。

以上研究表明二化螟肠道微生物群落结构可能与 Bt 杀虫蛋白的介入有关系。本文结果显示,不同处理的二化螟种群肠道微生物的丰富度存在差异,但这些菌株的差异是否对 Bt 杀虫制剂抗药性的产生存在一定关联,还需要今后深入研究。

参考文献（References）

Amann RI, Ludwig W, Schleifer KH, 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.*, 59(1): 143 – 169.

Brand JM, Bracke JW, Markovetz AJ, Wood DL, Browne LE, 1975. Production of verbenol pheromone by a bacterium isolated from bark beetles. *Nature*, 254: 136 – 137.

Broderick NA, Raffa KF, Goodman RM, Handelsman J, 2004. Census of the bacterial community of the gypsy moth larval midgut by using culturing and culture-independent methods. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70(1): 293 – 300.

Broderick NA, Raffa KF, Handelsman J, 2006. Midgut bacteria required for *Bacillus thuringiensis* insecticidal activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103(41): 15196 – 15199.

Broderick NA, Robinson CJ, McMahon MD, Holt J, Handelsman J, Raffa KF, 2009. Contribution of gut bacteria to *Bacillus thuringiensis*-induced mortality vary across a range of Lepidoptera. *BMC Biol.*, 7(11): 11 – 19.

Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK, Fierer N, Peña AG, Goodrich JK, Gordon JI, Huttley GA, Kelley ST, Knights D, Koenig JE, Ley RE, Lozupone CA, McDonald D, Muegge BD, Pirrung M, Reeder J, Sevinsky JR, Turnbaugh PJ, Walters WA, Widmann J, Yatsunenko T, Zaneveld J, Knight R, 2010. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat. Meth.*, 7(5): 335 – 336.

Dillon RJ, Vennard CT, Buckling A, Charnley AK, 2005. Diversity of locust gut bacteria protects against pathogen invasion. *Ecol. Lett.*, 8(12): 1291 – 1298.

Dillon RJ, Vennard CT, Charnley AK, 2002. A note: gut bacteria produce components of a locust cohesion pheromone. *J. Appl. Microbiol.*, 92(4): 759 – 763.

Edgar RC, 2010. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics*, 26(19): 2460 – 2461.

Felsenstein J, 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, 39(4): 783 – 791.

Huang SW, 2012. Study on Microbiota Diversity and Cellulolytic Bacterial Community in the Hindgut of *Holotrichia parallela* Larvae (Coleoptera: Scarabaeidae). PhD Dissertation, Huazhong Agricultural University, Wuhan. [黄胜威, 2012. 暗黑鳃金龟幼虫肠道微生物分子多态性及纤维素降解菌多样性研究. 武汉: 华中农业大学博士学位论文]

Jiang WY, Dai PL, Zhang YJ, Zhou T, Lin Y, Shu CL, Zhang J, 2010. Effect of transgenic cotton with cry1Ac gene on intestinal bacterial community of *Apis mellifera ligustica*. *Chin. J. Appl. Environ. Biol.*, 16(2): 211 – 215. [姜玮瑜, 代平礼, 张永军, 周婷, 林毅, 束长龙, 张杰, 2010. 转 Bt-*cry1Ac* 基因棉花对意大利蜜蜂肠道细菌群落的影响. 应用环境生物学报, 16(2): 211 – 215]

Johnston PR, Crickmore N, 2009. Gut bacteria are not required for the insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* toward the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 75(15): 5094 – 5099.

Kumar S, Tamura K, Nei M, 2004. MEGA 3: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Brief Bioinform.*, 5(2): 150 – 163.

Li XX, 2010. Analysis of Gut Bacteria Diversity from Rice Planthoppers. MSc Thesis, Nanjing Agricultural University, Nanjing. [李香香, 2010. 稻飞虱肠道细菌多样性分析. 南京: 南京农业大学硕士学位论文]

Magoč T, Salzberg SL, 2011. FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies. *Bioinformatics*, 27(21): 2957 – 2963.

Mrázek J, Štrosová L, Fliegerová K, Kott T, Kopečny J, 2008. Diversity of insect intestinal microflora. *Folia Microbiol.*, 53(3): 229 – 233.

Muyzer G, de Waal EC, Uitterlinden AG, 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59(3): 695 – 700.

Rani A, Sharma A, Rajagopal R, Adak T, Bhatnagar RK, 2009. Bacterial diversity analysis of larvae and adult midgut microflora using culture-dependent and culture-independent methods in lab-reared and field-collected *Anopheles stephensi* – an Asian malarial vector. *BMC Microbiol.*, 9(96): 1471 – 2180.

Raymond B, Johnston PR, Wright DJ, Ellis RJ, Crickmore N, Bonsall MB, 2009. A mid-gut microbiota is not required for the pathogenicity of *Bacillus thuringiensis* to diamondback moth larvae. *Environ. Microbiol.*, 11(10): 2556 – 2563.

Storelli G, Defaye A, Erkosar B, Hols P, Royet J, Leulier F, 2011. *Lactobacillus plantarum* promotes *Drosophila* systemic growth by modulating hormonal signals through TOR-dependent nutrient sensing. *Cell Metab.*, 14(3): 403 – 414.

Wang DH, Wu WJ, Fu YG, 2012. Bacterial community in *Aleyrodicus disperses* (Hemiptera: Aleyrodidae) estimated by PCR-DGGE and 16S rRNA gene library analysis. *Acta Entomol. Sin.*, 55(7): 772 – 781. [王甸洪, 吴伟坚, 符悦冠, 2012. 螺旋粉虱成虫体

内细菌群落多样性的 PCR-DGGE 和 16S rRNA 文库序列分析. 昆虫学报, 55(7): 772 - 781]

Wang Q, Garrity GM, Tiedje JM, Cole JR, 2007. Naïve Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Appl. Environ. Microbiol.*, 73(16): 5261 - 5267.

Xiang H, Li MW, Zhao Y, Zhao LP, Zhang YH, Huang YP, 2007. Bacterial community in midguts of the silkworm larvae estimated by PCR-DGGE and 16S rDNA gene library analysis. *Acta Entomol. Sin.*, 50(3): 222 - 233. [相辉, 李木旺, 赵勇, 赵立平, 张月华, 黄勇平, 2007. 家蚕幼虫中肠细菌群落多样性的 PCR-DGGE 和 16S rDNA 文库序列分析. 昆虫学报, 50(3): 222 - 233]

Zhang H, Xue Y, Hou YF, Wang KM, Zhang ZG, Li MS, Yu ZN, 2012. Effect of gut bacteria to the insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* toward *Helicoverpa armigera*. *Biotech. Bull.*, (7): 176 - 180. [张浩, 薛妍, 候艳飞, 王开梅, 张志刚, 李明顺, 喻子牛, 2012. 肠道菌对苏云金芽孢杆菌杀虫活性的研究. 生物技术通报, (7): 176 - 180]

Zhang JF, He YP, Chen JM, 2013. Diversity analysis of bacterial community in midguts of larvae of the striped stem borer, *Chilo suppressalis* (Lepidoptera: Crambidae), with different levels of resistance to insecticides. *Acta Entomol. Sin.*, 56(9): 1075 - 1082. [张珏峰, 何月平, 陈建明, 2013. 不同抗药性水平二化螟幼虫中肠细菌群落多样性分析. 昆虫学报, 56(9): 1075 - 1082]

(责任编辑: 赵利辉)